

---

—総説—

## 糖尿病網膜症の発症進展における ポリオール代謝経路の関与

加藤憲明

**要約：**血管合併症である糖尿病網膜症は代謝異常により発症進展すると考えられている。周皮細胞は血管ネットワークにおいて、内皮細胞の安定化や成熟の他に内皮細胞の刺激および誘導に関与している。一旦、周皮細胞-内皮細胞の相互関係が破綻すると、基底膜の肥厚および血管透過性の亢進が起これ、増殖網膜症へ進展していく。我々はポリオール代謝に注目し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いて、ポリオール代謝異常と周皮細胞の障害について検討した。アルドース還元酵素阻害剤によるポリオール代謝異常の是正は網膜毛細血管での周皮細胞消失、基底膜肥厚および毛細血管瘤の発現を抑制した。そこで、ポリオール代謝の意義を明らかにする為に、培養周皮細胞を用いて、ポリオール代謝の増強が細胞障害を強めるかどうかを検討した。周皮細胞の障害はポリオール代謝の増強によって強まった。続いて、我々は2型糖尿病モデルである自然発症糖尿病トリー（SDT）ラットを用いて、ポリオール代謝異常の抑制作用が進行した網膜症に有効であるか検討した。ポリオール代謝の抑制は進行した網膜症を抑制した。以上より、ポリオール代謝異常は糖尿病網膜症の発症期から進行期の全般にわたり関係することが示唆された。

**索引用語：**周皮細胞、毛細血管瘤、ポリオール代謝、アルドース還元酵素阻害剤、糖尿病網膜症

## The Association of Polyol Pathway in Onset and Progression of Diabetic Retinopathy

Noriaki KATO

**Abstract:** The pathological changes of diabetic retinopathy, a vascular complication of diabetes, are thought to be caused by metabolic disturbances. Pericytes are involved in endothelial cell stimulation and guidance, as well as in endothelial stabilization and maturation in the vascular network. Once the pericyte-endothelial cell interaction breaks down, thickening of the basement membrane and increase in permeability occur, resulting in the onset of proliferative retinopathy. We focused on the polyol pathway, and investigated the association between the abnormality of the polyol pathway and the pericyte damage in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. Correction of the polyol pathway disturbance by treatment with an aldose reductase inhibitor inhibited the onset of pericyte loss, thickening of the basement membrane and development of microaneurysms of the retinal capillaries. Therefore, to elucidate the significance of the polyol pathway, we examined whether activation of the pathway may potentiate the damage to the retinal pericytes. The damage to the pericytes was potentiated by activation of the polyol pathway. Furthermore, we investigated the inhibitory effects of the polyol pathway on advanced diabetic retinopathy in spontaneously diabetic Torii rats, a type II diabetic model. Correction of the disturbed polyol pathway suppressed the progression of diabetic retinopathy. In conclusion, these results suggest that abnormality of the polyol pathway may contribute to the pathology in all stages of diabetic retinopathy.

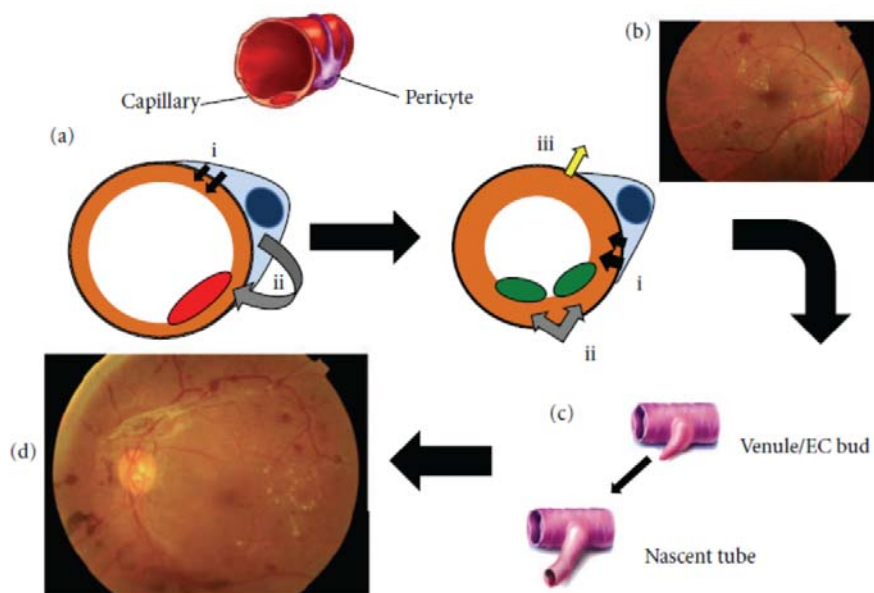
**Key phrases:** pericytes, microaneurysm, polyol pathway, aldose reductase inhibitor, diabetic retinopathy

## 1. 緒言

厚生労働省が定期的に行っている国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる人は平成9年 約690万人、平成14年 約740万人であり、最も新しい平成19年の調査では約890万人と報告されている<sup>1)</sup>。福岡県久山町が実施した平成15年の疫学調査では、40歳以上の全住民の2%が糖尿病網膜症と報告されており、この結果を全国の40歳以上の総人口に換算すると、糖尿病網膜症患者数は約134万人と推定されている<sup>2)</sup>。平成19年の調査では糖尿病が強く疑われる人と糖尿病の可能性を否定できない人を合わせると約2210万人と試算されていることから、糖尿病網膜症の潜在的な患者数は非常に多いことが予測できる。

初期網膜症である単純網膜症では、毛細血管瘤、網膜出血、硬性白斑および網膜浮腫が発現し、増殖前網膜症を経て増殖網膜症へと進展すると、新生血管、線維血管性増殖組織が形成され、硝子体出血や牽引性網膜剥離が起こり、重度の視力障害（失明）に至る<sup>3)</sup>。後天性視力障害の原因疾患として、糖尿病網膜症は緑内障に次いで第2位、視力障害者の1/5を占め、大きな社会問題になっている。糖尿病網膜症は網膜血管の疾患であり、特に毛細血管の周皮細胞

や内皮細胞が高血糖状態で障害されて発症するとされている。病変の主座である網膜毛細血管は、管腔構造を形成する内皮細胞とその周囲で基底膜を共有して被覆する周皮細胞から成るが、相互が密接に作用して、血管機能の恒常性を維持している。周皮細胞は、1) 可溶性メディエーターや細胞-細胞間接触を通じて内皮細胞とコミュニケーションをとり、2) 基底膜の合成、再構築および維持を図り、3) Rho シグナルを介して微小血管の緊張を調整している<sup>4)</sup>。また、周皮細胞は内皮細胞の成長<sup>5)</sup>および遊走<sup>6)</sup>を抑制する。網膜の毛細血管では他組織の毛細血管に比べ、周皮細胞の比率が非常に高い<sup>7)</sup>。したがって、網膜毛細血管で周皮細胞が障害を受けた場合、周皮細胞および内皮細胞の機能的相互作用の破綻を招き、基底膜肥厚や網膜血管透過性の亢進が起これと考えられている。基底膜肥厚は血管の剛性を増し血管拡張機能を低下させて、微小循環障害や虚血状態を招き、それによって過剰産生される血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) によって、血管新生を伴った増殖網膜症に進展すると考えられている (Fig. 1<sup>8)</sup>)。



**Fig. 1 Schematic representation of the progression of diabetic retinopathy**

Pericytes interact directly with the normal retinal capillary endothelium (a) within the basement membrane via close contacts and gap junctions ensuring basal tone a(i) and growth arrest a(ii). Persistent hyperglycemia leads to RhoGTPase induction of pericyte contraction b(i) causing reversal of EC growth arrest b(ii) and disrupted matrix contact b(iii) prior to or in the absence of pericyte death/dropout. Basement membrane thickening and leaky, narrow capillaries contribute to thrombosis, ischemia, and the first detectable abnormalities of NPDR. In response to the resultant hypoxia, soluble mediators of angiogenesis, such as VEGF, are released to develop collateral nutrient supply by forming nascent capillary tubes (c). These new blood vessels are highly permeable and fragile and disrupt easily causing hemorrhage and the vision loss characteristic of PDR (d). (Reprinted from Willard et al.(2012), with permission)

糖尿病網膜症での主な代謝異常ではポリオール代謝 (polyol pathway) 異常、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) の活性化、酸化ストレス (oxidative stress) 増大およびグリケーション (glycation) 促進が報告され、中でもポリオール代謝は PKC 活性化、酸化ストレス増大およびグリケーション促進と密接に関連している (Fig. 2<sup>9)</sup>)。ポリオール代謝は2段階からなる簡単な系であり、第1反応はアルドース還元酵素 (aldose reductase: AR, EC 1.1.1.21) が還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form: NADPH) を補酵素にして、ソルビトール (sorbitol) を産生し、第2反応ではソルビトール脱水素酵素 (sorbitol dehydrogenase: SDH, EC 1.1.1.14) が、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide: NAD) を補酵素にして、フルクトース (fructose) を産生する。ポリオール代謝亢進による NADPH 過剰消費は還元型グルタチオン (reduced glutathione: GSH) の減少を招き、酸化ストレスが増大する。また NAD の過剰消費は de novo のジアシルグリセロール (diacylglycerol: DAG) 合成を促進し、その結果、PKC を活性化させると考えられている。グリケーションはポリオール代謝から生成されるフルクトースおよびその代謝物により亢進するとされている。主要な代謝異常とリンクすることから、ポリオール代謝異常は糖尿病網膜症の発症および進展に密接に関与していると考えられている。

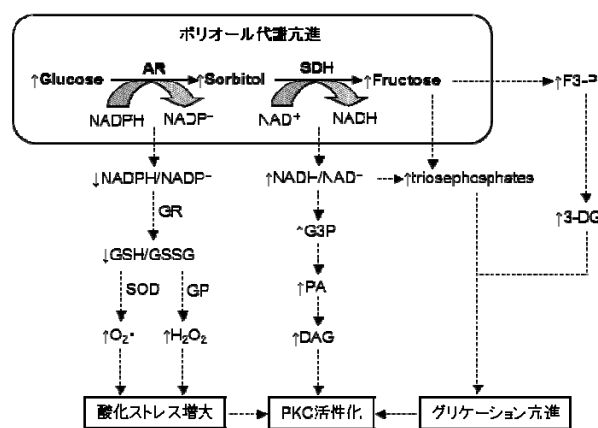


Fig. 2 Acceleration of polyol pathway and related metabolic disturbances

AR: aldose reductase, SDH: sorbitol dehydrogenase, GR: glutathione reductase, GP: glutathione peroxidase, SOD: superoxide dismutase, DAG: diacylglycerol, G3P: glycerol 3-phosphate, PA: phosphatidic acid, F3-P: fructose 3-phosphate, 3-DG: 3-deoxyglucosone

ポリオール代謝の律速酵素である AR は血管周皮細胞に存在していることが報告されている<sup>10)</sup>。本総説では、1 型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン (streptozotocin: STZ) 誘発糖尿病ラットを用いて、網膜の周皮細胞の障害

および毛細血管病変がポリオール代謝異常とどう関係するのか AR 阻害剤であるフィダレスタット

{(+)-(2S,4S)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro[chroman-4'

-imidazolidine]-2-carboxamide} を用いて検討した。また、SDH 過剰発現培養周皮細胞を用いて、ポリオール代謝異常が細胞障害にどのように影響するのか、活性酸素種

(reactive oxygen species: ROS) 産生、<sup>[3H]</sup>Thymidine 取り込み量および VEGF 発現に対するフィダレスタットの作用で検討した。網膜症は重症化すると、増殖性変化を呈してくる。ポリオール代謝異常の是正が増殖性変化を伴ったより進行した網膜症にも有効であるかどうかを、自然発症糖尿病トリイ (Spontaneously Diabetic Torii: SDT) ラット (2 型糖尿病モデル) を用いて、網膜病変の頻度および眼内液中 VEGF 蛋白に対するフィダレスタットの作用をもとに検討した。

## 2. 網膜の毛細血管病変とポリオール代謝異常の関係

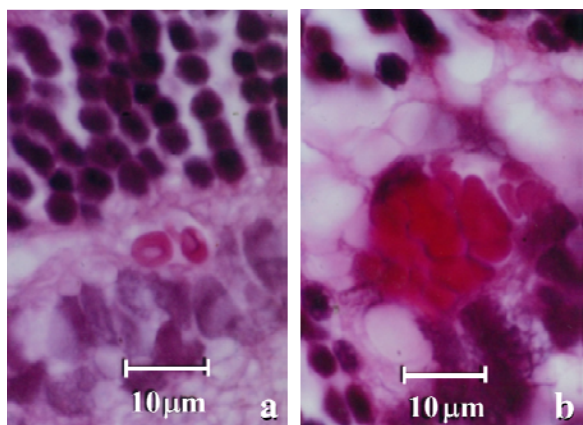
### STZ 誘発糖尿病ラットの毛細血管病変に対するフィダレスタットの作用

雄性スプラーグドーリー (Spague-Dawley: SD) ラットに 0.05 M のクエン酸緩衝液に溶解した STZ

(Sigma-Chemical Co.) を 40 mg/kg の割合でラット尾静脈内に投与して糖尿病を誘発した。STZ 投与後 4 日目の血漿中グルコース濃度が 15.8 mmol/L 以上のラットを糖尿病とし、次の 4 群に群分けした: (1) 糖尿病対照群 (diabetic control group)、(2) 0.5 mg/kg/day フィダレスタット投与糖尿病群 (0.5 mg/kg/day fidarestat-treated diabetic group)、(3) 1 mg/kg/day フィダレスタット投与糖尿病群 (1 mg/kg/day fidarestat-treated diabetic group)、(4) 2 mg/kg/day フィダレスタット投与糖尿病群 (2 mg/kg/day fidarestat-treated diabetic group)。フィダレスタットは 5% アラビアゴム溶液に懸濁して、糖尿病誘発後 4 日目より、1 日 1 回、15 ヶ月間強制経口投与した。薬物最終投与 3 時間後に、深麻酔下でラットの眼球を摘出し、病理評価に用いた。角膜に切り込みを入れたのち、眼球を 0.1 mol/l のカコジル酸緩衝液で調製した 1% glutaraldehyde 液で固定した。カコジル酸緩衝液で洗浄した後、パラフィンに包埋し、組織切片 (約 4 μm の厚さ) を作成した。血管基底膜の染色は periodic acid-Schiff 液を用いて行い、毛細血管瘤は hematoxyline-eosin 液で染色した後、Yanoff らの基準<sup>11)</sup>に従って同定した。糖尿病ラットの毛細血管の基底膜の厚さが正常血管の基底膜の厚さの 150% 以上の場合、肥厚ありとした<sup>12)</sup>。周皮細胞の消失は、網膜内網状層および外網状層に位置する血管について、周皮細胞の核と内皮細胞の核の比をもとに評価した<sup>13)</sup>。

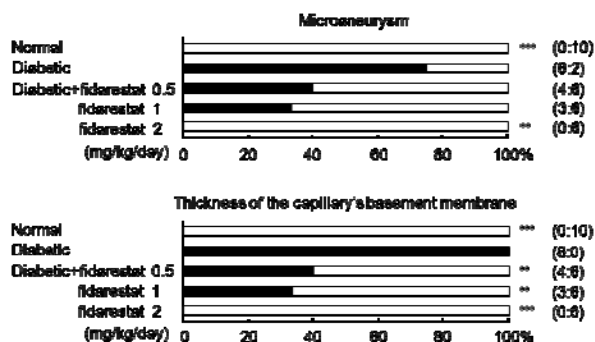
毛細血管瘤 (Fig. 3b) は糖尿病対照群で 8 匹中 6 匹 (有

病率 75%) 認められた (Fig. 4 上段)。正常群では認められなかった (10 匹中 0 匹)。フィダレストット 0.5 mg/kg/day 投与群、1 mg/kg/day 投与群および 2 mg/kg/day 投与群では 10 匹中 4 匹 (有病率 40%)、9 匹中 3 匹 (有病率 33%) および 6 匹中 0 匹 (有病率 0%) に毛細血管瘤が認められた (Fig. 4 上段)。フィダレストットの毛細血管瘤の発生に対する抑制効果は用量依存的であった。



**Fig. 3 Microaneurysm in the retinal capillaries of streptozotocin-induced diabetic rats**  
a: normal capillary, b: microaneurysm  
The result was cited from ref 14.

毛細血管の基底膜肥厚は糖尿病対照群の全例で認められた (Fig. 4 下段)。これに対して、フィダレストット投与群では毛細血管瘤の結果と同様に、用量依存的にその頻度は減少し、2 mg/kg/day 投与群では基底膜肥厚は認められ



なかった (Fig. 4 下段)。

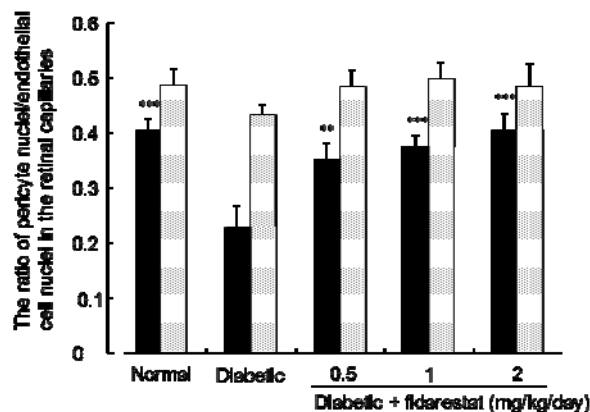
**Fig. 4 Effects of fidarestat on the histopathological changes in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats**

Each column represents the percent of appearance. Figures in parentheses indicate the number of rats with and without the change, respectively. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. diabetic control group (chi-square test). ■ : appearance, □ : absence

The result was cited from ref 14.

周皮細胞の消失は網膜外網状層と内顆粒層の間の部位

で認められた (Fig. 5)。フィダレストットは周皮細胞の消失を 0.5 mg/kg/day の用量から有意に抑制した (Fig. 5)。毛細血管瘤の有病率および周皮細胞の消失の相関係数を求めたところ、-0.94 であり、両者は負の相関を示した ( $P < 0.05$ )。



**Fig. 5 Effect of fidarestat on the decrease in pericytes in the retinal capillaries of streptozotocin-induced diabetic rats**

Each column and vertical line represents mean  $\pm$  S.E.M. for 6 to 10 rats. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. diabetic control group (ANOVA plus LSD methods). ■ : The area between the outer plexiform layer and the inner nuclear layer. □ : The area between the inner plexiform layer and the nerve fiber layer.

The result was cited from ref 14.

糖尿病対照群のソルビトール量は正常群に比べ、約 5 倍増加していた ( $0.05 \pm 0.01$  vs.  $0.26 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/g}$  tissue, 平均値  $\pm$  標準誤差,  $P < 0.001$ ) が、フィダレストットはこのソルビトール量増加を用量依存的に抑制した (0.5 mg/kg/day 投与群:  $0.21 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$  tissue, 1 mg/kg/day 投与群:  $0.20 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$  tissue ( $P < 0.05$ ), 2 mg/kg/day 投与群:  $0.17 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/g}$  tissue,  $P < 0.01$ )。糖尿病対照群の血漿中グルコース濃度は正常対照群に比べ約 3 倍増加していた ( $9.4 \pm 0.3$  vs.  $30.1 \pm 2.4$  mmol/L,  $P < 0.001$ ) が、フィダレストットはこれに影響しなかった。

### 3. 網膜周皮細胞障害におけるポリオール代謝の関与

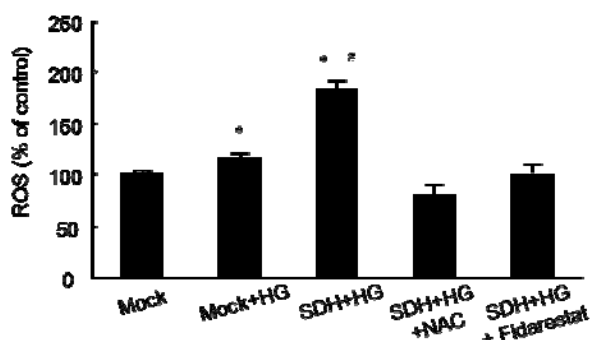
#### SDH 過剰発現培養周皮細胞の調製

ウシ網膜より周皮細胞を単離し、その細胞を 20% ウシ胎仔血清添加のダルベッコ変法イーグル培地 (Gibco-BRL) にて培養した。ヒト SDH のための cDNA コーディングはテンプレートとしてのヒト細小血管内皮細胞ラムダ cDNA ライブラリ (Stratagene) と 2 つのオリゴヌクレオチドプライマー (5' -GCACTCCAGAGCCAAAAGAG-3' および 5' -CTGAGATCCCAAGACTGTGG-3')<sup>15)</sup> を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した。PCR 増幅 cDNA

フラグメントは発現ベクターである pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) にクローンした。周皮細胞はヒト SDH cDNA か空のベクターのどちらかを FuGENE 6 トランスフェクション試薬 (Roche Diagnostics) を用いてトランスフェクションした。

#### 周皮細胞障害に対するフィダレストットの作用

細胞の障害は周皮細胞中 ROS 産生量、 $^3\text{H}$ Thymidine 取り込み量および周皮細胞中 VEGF mRNA 発現量で評価した。ROS 産生量は蛍光プローブである CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes) を用いて測定した。SDH または mock をトランスフェクションした細胞は、0.3  $\mu\text{M}$  のフィダレストットまたは 1 mM の *N*-acetylcysteine (NAC) の存在下で、5 mM または 30 mM のグルコースにて 2 日間インキュベートした。その後、細胞を 10  $\mu\text{M}$  の CM-H<sub>2</sub>DCFDA にて 37°C で 45 分間インキュベートしたのち、EZS-FL-蛍光プレートリーダー (Asahi Techno Glass) を用いて、EZScan-FL for Windows program の方法で測定を行った。 $^3\text{H}$ Thymidine 取り込み量は SDH または mock をトランスフェクションした細胞を、0.3  $\mu\text{M}$  のフィダレストットまたは 1 mM の NAC の存在下で、5 mM または 30 mM のグルコースにて 4 日間インキュベートした後測定した。VEGF mRNA は 0.3  $\mu\text{M}$  のフィダレストットまたは 1 mM の NAC の存在下で、5 mM または 30 mM のグルコースにて 6 日間インキュベートした SDH または mock をトランスフェクションした細胞から、Poly(A)<sup>+</sup> RNAs を取り出し、定量 RT-PCR 法にて測定した<sup>16)</sup>。周皮細胞中 ROS の産生は、5 mM に比べ 30 mM のグルコース濃度で軽度増加した。30 mM の ROS 産生量は SDH を過剰発現した細胞の方が、過剰発現していない細胞に比べ強力に増加していた (Fig. 6)。



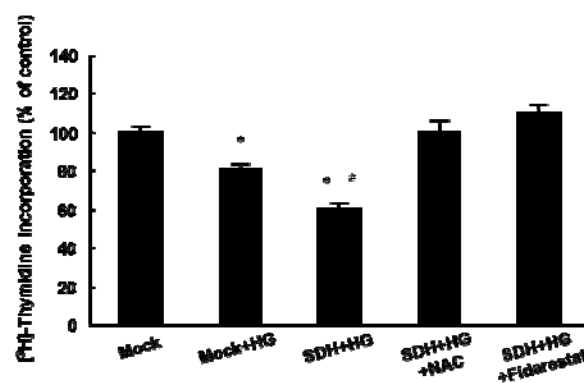
**Fig. 6** Effects of 5 or 30 mM glucose on intracellular reactive oxygen species generation in SDH- or mock-transfected pericytes

SDH- or mock-transfected pericytes were treated with 5 or 30 mM glucose in the presence or absence of 0.3 mM fidarestat or 1 mM NAC for 2 days. Then, reactive oxygen species were quantitatively analyzed. \*,  $P < 0.01$  vs. control with mock-transfected cells (Student's t-test). #,  $P < 0.01$  vs. mock-transfected 30 mM glucose-treated cells. HG, 30 mM glucose; SDH, sorbitol dehydrogenase; NAC, *N*-acetylcysteine; ROS, reactive oxygen species.

The result was cited from ref 17.

しかし、SDH 過剰発現は 5 mM における ROS 産生には影響しなかった (データ示さず)。ポリオール代謝の最初の反応を阻害するフィダレストットは SDH 過剰発現細胞の ROS 産生量増強を完全に抑制した (Fig. 6)。

細胞への $^3\text{H}$ Thymidine 取り込み量は高グルコース刺激により軽度であるが、有意に減少した。SDH 過剰発現により取り込み量はさらに減少した (Fig. 7)。フィダレストットは ROS 産生抑制作用と同様に、SDH 過剰発現細胞における $^3\text{H}$ Thymidine 取り込み量減少を完全に抑制した (Fig. 7)。



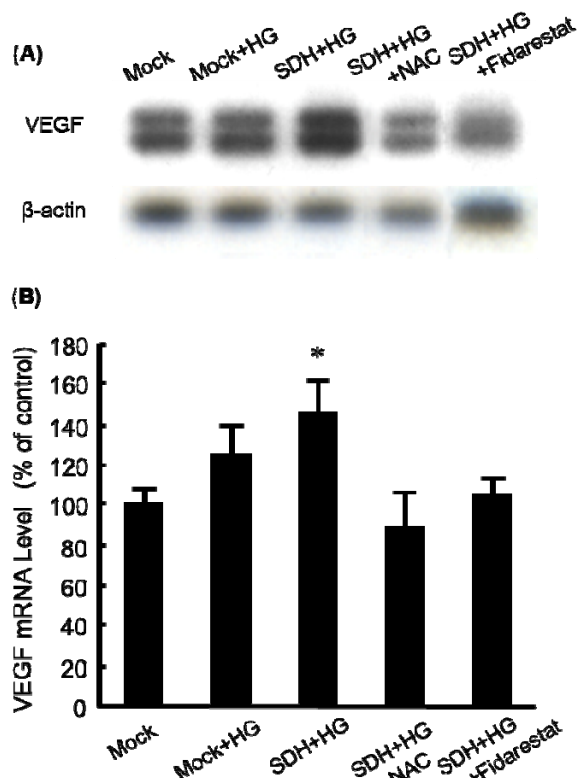
**Fig. 7** Effects of 5 or 30 mM glucose on  $^3\text{H}$ thymidine incorporation in SDH- or mock-transfected pericytes.

SDH- or mock-transfected pericytes were treated with 5 or 30 mM glucose in the presence or absence of 0.3 mM fidarestat or 1 mM NAC for 4 days, and then,  $^3\text{H}$  thymidine incorporation was determined as described under 'Material and methods.' \*,  $P < 0.01$  vs. control with mock-transfected cells (Student's t-test). #,  $P < 0.01$  vs. mock-transfected 30 mM glucose-treated cells. HG, 30 mM glucose; SDH, sorbitol dehydrogenase; NAC, *N*-acetylcysteine.

The result was cited from ref 17.

高グルコース刺激により周皮細胞の血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA 発現は有意に増加したが、SDH 過剰発現によりさらに増加した (Fig. 8)。フィダレストットおよび NAC は SDH 過剰発現細胞の VEGF mRNA 発現の増強を抑制した (Fig. 8)。

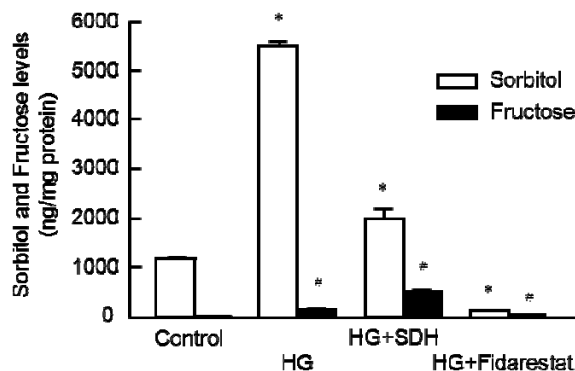




**Fig. 8** Effects of 5 or 30 mM glucose on VEGF mRNA regulation in SDH- or mock-transfected pericytes (A) SDH- or mock-transfected pericytes were treated with 5 or 30 mM glucose in the presence or absence of 0.3 mM fidarestat or 1 mM NAC for 6 days, and then 30 ng poly(A)<sup>+</sup> RNAs were transcribed and amplified by PCR. Each lower panel shows the expression of b-actin genes. PCR amplification for b-actin mRNA was performed for 25 cycles. (B) Quantitative representation of VEGF gene induction. Data were normalized by the intensity of b-actin mRNA-derived signals and related to the value of the control with mock-transfected cells. \*,  $P < 0.01$  compared to the value of the control with mock-transfected cells (Student's t-test). HG, 30 mM glucose; SDH, sorbitol dehydrogenase; NAC, N-acetylcysteine; VEGF, vascular endothelial growth factor. The result was cited from ref 17.

#### 周皮細胞中ポリオール代謝異常に対するフィダレストットの作用

SDH をトランスフェクションした細胞、またはしていない細胞を、0.3  $\mu$ M のフィダレストットの存在下または非存在下において、5 mM または 30 mM のグルコースにて 6 日間インキュベートした。細胞中ソルビトール量およびフルクトース量の測定を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法により行った<sup>18)</sup>。高グルコース刺激により周皮細胞中ソルビトール量およびフルクトース量は有意に増加したが、フィダレストットはこれらの増加を強力に抑制した (Fig. 9)。



**Fig. 9** Effects of 5 or 30 mM glucose on intracellular sorbitol and fructose levels in cultured pericytes SDH- or non-transfected pericytes were treated with 5 or 30 mM glucose in the presence or absence of 0.3 mM fidarestat for 6 days. Then, intracellular sorbitol and fructose levels were determined as described under 'Materials and methods'. \* and #,  $P < 0.01$  compared to sorbitol and fructose levels of the control cells, respectively (Student's t-test). HG, 30 mM glucose; SDH, sorbitol dehydrogenase. The result was cited from ref 17.

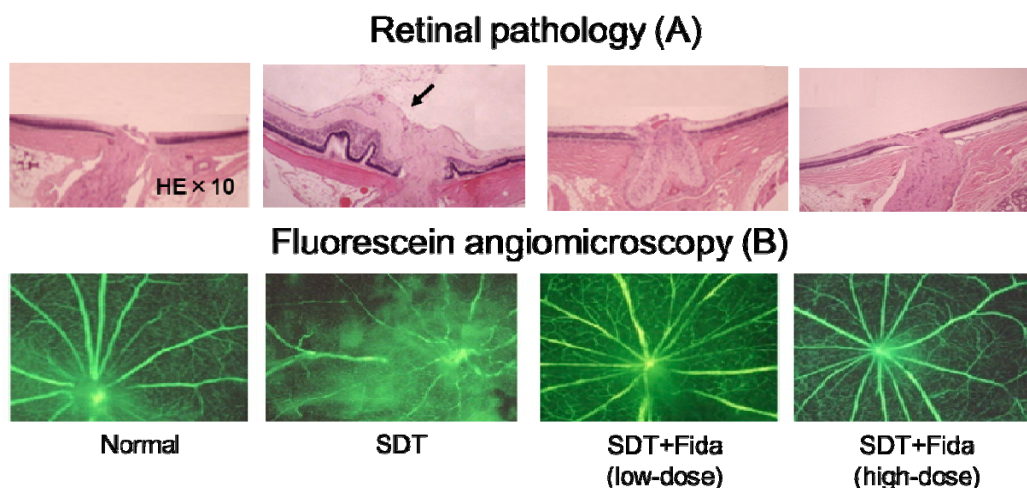
#### 4. 増殖性網膜病変とポリオール代謝異常の関係

##### SDT ラットの増殖性網膜病変に対するフィダレストットの作用

日本クレアより入手した雄性 SDT ラットおよび SD ラットを実験に用いた。SDT ラットのうち、随時血糖が 19.4 mmol/L 以上のラットを糖尿病が発症したものとみなし、

(1) 糖尿病対照群 (SDT)、(2) 低用量フィダレストット投与群 (8 mg/kg/day)、(3) 高用量フィダレストット投与群 (32 mg/kg/day) に群わけした。フィダレストット投与群の SDT ラットには、標準飼料 (CRF-1, Oriental Yeast Co, Ltd., Tokyo, Japan) にフィダレストットを含有した混合飼料を糖尿病発症時 (約 20 週齢) から 40 週間与えた。40 週間投与後に蛍光血管造影法および病理組織学的手法にて網膜症の評価を行った。病理組織学的评价是深麻酔下にて摘出した眼球を固定液 (mixture of 2.5% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.15 M phosphate buffer) に浸して固定した後、洗浄してパラフィンに包埋した。作成した厚さ 4  $\mu$ m の切片を hematoxyline-eosin 液で染色して、既報<sup>19)</sup>に準じて、糖尿病ラットに牽引性網膜剥離に類似した網膜隆起または視神経周囲に広範囲の蛍光漏出が認められた場合に進行した網膜症ありとした。

糖尿病網膜症の有病率はフィダレストット低用量および高用量投与群はいずれも 0% (0/14 眼および 0/21 眼) であり、糖尿病対照群の有病率 66.6% (2/18 眼) より有意に低かった ( $P < 0.001$ )。糖尿病網膜症の典型的な変化、例えば、牽引性網膜剥離に類似した網膜隆起は糖尿病対照群に多く認められたが、フィダレストット投与群では認められなかった (Fig. 10A)。蛍光血管造影でみられた特徴的



**Fig. 10 Effect of fidarestat on diabetic retinopathy**

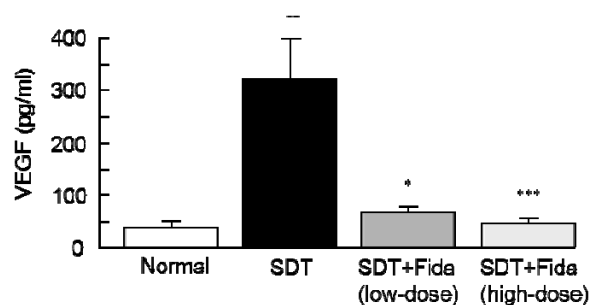
(A): Large retinal folds mimic tractional retinal detachment (arrow) in SDT control group, but not in fidarestat-treated SDT groups and normal group. B): Extensive leakage of fluorescein around the optic disc in SDT control group, but not in fidarestat-treated SDT groups and normal group. SDT, spontaneously diabetic Torii rat; Fida, fidarestat. The result was cited from ref 20.

な変化は視神経周囲の広範囲な蛍光漏出であり、糖尿病対照群では多く認められたが、フィダレスタット投与群では認められなかった (Fig. 10B)。

#### SDT ラットの眼内液中 VEGF 蛋白増加および網膜中ポリオール代謝異常に対するフィダレスタットの作用

眼内液 (房水および硝子体液の混液) 中 VEGF 蛋白濃度の測定はサンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA) にて、マウス VEGF 測定キット (R&D System) を用いて測定した。糖尿病対照群の VEGF 蛋白量 ( $324.7 \pm 76.4$  pg/ml) は正常群 ( $40.4 \pm 10.0$  pg/ml) に比べ、有意に高値であった ( $P < 0.01$ , Fig. 11)。フィダレスタットは、この VEGF 蛋白の増加を用量依存的に抑制した (低用量群:  $65.3 \pm 4.5$  pg/ml,  $P < 0.05$ , 高用量群:  $47.7 \pm 10$  pg/ml,  $P < 0.001$ )。

糖尿病対照群の網膜中ソルビトール量 ( $23.2 \pm 4.7$  nmol/mg protein, 平均値  $\pm$  標準誤差) は正常群 ( $1.1 \pm 0.1$  nmol/mg protein) に比べ、有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。フィダレスタット投与群では、低用量群が  $2.7 \pm 1.1$  nmol/mg protein ( $P < 0.01$ ) であり、高用量群は  $0.7 \pm 0.2$  nmol/mg protein ( $P < 0.001$ ) であった。糖尿病対照群の網膜中フルクトース量 ( $13.7 \pm 1.2$  nmol/mg protein) は正常群 ( $3.7 \pm 0.9$  nmol/mg protein) に比べ、有意に高値であった ( $P < 0.001$ )。フィダレスタット投与群では、低用量群が  $6.8 \pm 5.0$  nmol/mg protein であり、高用量群は  $6.3 \pm 2.5$  nmol/mg protein であった。SDT 対照群の血漿中グルコース濃度は正常群に比べ有意に高かった ( $9.3 \pm 0.4$  vs.  $42.8 \pm 3.4$  mmol/L,  $P < 0.001$ ) が、フィダレスタットは SDT ラットの血漿中グルコース濃度に影響を与えなかった。



**Fig. 11 Effect of fidarestat on the increase in vascular endothelial growth factor in ocular fluids in spontaneously diabetic Torii rats**

Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. for 6 to 9 rats.

##,  $P < 0.01$  vs. normal group (Student's t-test). \*,  $P < 0.05$ ;

\*\*\*,  $P < 0.001$  vs. SDT control group (Dunnett's test). SDT, spontaneously diabetic Torii rats; Fida, fidarestat; VEGF, vascular endothelial growth factor. The result was cited from ref 20.

## 5. 考察

STZ 誘発糖尿病ラットを用いて、網膜の周皮細胞の消失と毛細血管病変 (毛細血管瘤、血管基底膜肥厚) の発現について検討し、AR 阻害剤でこれら病変が抑制されるか検討した。本検討では、STZ 糖尿病ラットの初期網膜病変である周皮細胞の消失、毛細血管基底膜の肥厚および毛細血管瘤が AR 阻害剤であるフィダレスタットによって抑制されることが示された。周皮細胞の障害が糖尿病網膜症の発症に関係することが示唆されたことから、周皮細胞にヒト SDH を過剰発現させ、ポリオール代謝異常が周皮細胞の障害にどう関与しているかを検討した。高グルコース濃度曝露により周皮細胞の ROS 産生量および VEGF mRNA 発

現は増加し、 $[^3\text{H}]$ Thymidine 取り込み量は減少した。これらの変化は SDH を過剰発現するとさらに強まった。フィダレスタットは SDH 過剰発現細胞における増強作用をいづれも抑制した。

周皮細胞は内皮細胞の増殖、分化および毛細血管の血流を制御することから、細小血管の局所ホメオスタシス、すなわち全身循環の維持に重要な役割を果たしている<sup>21)</sup>。網膜において、周皮細胞の消失は血管壁の脆弱化を招き、毛細血管瘤を惹起する。毛細血管瘤は、網膜外網状層および内顆粒層の間で発現し、同じ部位で周皮細胞の消失が観察された。さらに、周皮細胞の消失が毛細血管瘤の発現頻度と相関することが示された。AR はシュワン細胞およびメサングウム細胞と同様に、周皮細胞に存在している<sup>10)</sup>。これらの結果より、糖尿病では周皮細胞内のポリオール代謝が亢進し、これをきっかけとして周皮細胞が変性し、脱落すると考えられた。強力な AR 阻害薬であるフィダレスタットは網膜中ポリオール代謝異常を抑制し、さらに周皮細胞の消失および毛細血管瘤の発現を抑制したこと、ポリオール代謝異常が糖尿病網膜症の発症に密接に関連していることが示唆された。一方、他の病理所見として、網膜毛細血管の基底膜肥厚が糖尿病対照群の全例で観察された。基底膜肥厚は基底膜の剛性を増し血管拡張機能を低下させて、微小循環障害や虚血を起し<sup>22)</sup>、この微小循環障害が糖尿病網膜症の進行の主たる危険因子である VEGF の産生を増加させると考えられる<sup>23)</sup>。フィダレスタットは毛細血管の基底膜肥厚を用量依存的に抑制したこと、糖尿病での網膜中ポリオール代謝異常の抑制が、VEGF の増加を抑制し、それが結果的に糖尿病網膜症の発症抑制につながっている可能性も考えられる。

本検討において、SDH 過剰発現は高グルコース曝露の周皮細胞の ROS 産生を増強させることが示された。増加した ROS が周皮細胞の障害を増強することは次の事実から明らかである：(1) SDH 過剰発現によって、高グルコース曝露による周皮細胞の $[^3\text{H}]$ Thymidine 取り込み量の減少および VEGF mRNA 発現の増加がさらに強まった。(2) 抗酸化物質である NAC が、高グルコース曝露時の SDH 過剰発現による周皮細胞の ROS 産生増強を完全に抑制し、 $[^3\text{H}]$ Thymidine 取り込み量減少および VEGF mRNA 発現増加を抑制した。フィダレスタットは 30 mM グルコースにおいて増強した SDH 過剰発現周皮細胞の $[^3\text{H}]$ Thymidine 取り込み量減少を完全に抑制した。また、周皮細胞中のソルビトール蓄積を抑制した。一方、SDH 過剰発現は、5 mM グルコースでは ROS 産生に影響を与えなかった。これらの結果は、高グルコースでのソルビトール蓄積が SDH による ROS 産生反応の律速段階であることを示唆している。したがって、ポリオール代謝の 2 番目の反応を触媒する SDH は、周皮細胞の障害に密接に関わっていると考えられ、ソルビトール蓄積を AR 阻害薬のフィダレスタットで

抑制することは、SDH 過剰発現による有害反応から周皮細胞を保護する上で有用であると考えられた。

周皮細胞は内皮細胞の異常増殖を抑制し、内皮細胞のプロスタサイクリン産生能力の維持に関与することで細小血管の恒常性維持に中心的な役割を果たしている<sup>24)</sup>。VEGF は糖尿病網膜症の多くの機能変化および構造変化に関与している<sup>23), 25-27)</sup>。したがって、SDH による周皮細胞障害および VEGF 産生は、周皮細胞および内皮細胞の機能的相互作用の破綻を招き、網膜血管透過性亢進、血栓形成および血管形成など糖尿病網膜症にみられる臨床所見を引き起こす要因となると考えられる。Tilton ら<sup>28)</sup>はソルビトールレベルが 11 倍に増加しているにもかかわらず、SDH 阻害薬が糖尿病ラットの眼内組織中の血管機能障害を改善したと報告している。この報告は本検討結果を支持するものであり、糖尿病網膜症の発症に SDH が重要であることを示唆している。以上の検討より、糖尿病網膜症には周皮細胞の障害が重要であり、ポリオール代謝異常が密接に関与していることが示唆されたが、より進んだ網膜症ではその関与は変わるのだろうか。それを検討する為に、進行した糖尿病網膜病変を呈する SDT ラットを用いて、フィダレスタットの有効性を検討した。SDT ラット長期モデルでは、牽引性網膜剥離に類似の網膜隆起および視神経周囲での広範囲の蛍光漏出が認められた。網膜では、ポリオール（ソルビトールおよびフルクトース）の増加がみられ、眼内液では VEGF の増加がみられた。フィダレスタットはいずれの代謝パラメーターの異常も用量依存的に抑制し、糖尿病網膜症の発現を強力に抑制した。本検討により、高血糖下でのポリオール代謝異常の抑制作用は VEGF 増加を抑制し、進行した網膜症発現を抑制したものと考えられた。

STZ ラットでは、発現する変化が毛細血管瘤および血管基底膜肥厚などの初期変化であり、増殖性の変化は発現しない。これに対して、SDT ラットは進行した網膜病変、すなわち、網膜肥厚を伴った牽引性網膜剥離および視神経周囲の広範囲の血管透過性亢進が発現する<sup>19), 29-30)</sup>。SDT ラットの血糖値は STZ ラットに比べてはるかに高い。したがって、SDT ラットでは、ポリオール代謝の亢進が STZ ラットに比べより強く起こり、VEGF 産生の程度も強くなると考えられる。STZ ラットおよび SDT ラットの検討において、フィダレスタットは血糖に対して作用を示していないことから、一連の網膜症への作用は血糖コントロールによるものでなく、ポリオール代謝亢進の抑制によるものである。

VEGF は増殖網膜症を引き起こす重要な蛋白である<sup>31-32)</sup>。VEGF は網膜内の血管透過性を亢進し、血管新生を促して、最終的に血管新生緑内障を形成する<sup>33)</sup>。網膜内の血管新生は硝子体出血と牽引性網膜剥離の主な原因となる。増殖網膜症に合併して発症する血管新生緑内障は VEGF 産生



による最も悲惨な結果である。SDT ラットは目立った網膜内血管新生を示さないが、血管透過性の亢進は顕著にみられた。眼内液中の VEGF 蛋白量はフィダレスタットの投与によって、ほぼ正常レベルまで抑制されたことから、この作用が血管透過性亢進および牽引性網膜剥離の抑制につながる可能性が示唆された。

以上の結果より、ポリオール代謝異常は初期糖尿病網膜症だけでなく、増殖性変化を伴う進行した網膜症に関与することが明らかとなった。

## 6. 結論

STZ 誘発糖尿病ラットは網膜内の毛細血管において、周皮細胞の消失を示し、フィダレスタットはこの周皮細胞の消失を抑制した。また、毛細血管の基底膜肥厚および毛細血管瘤の発現を抑制した。周皮細胞の消失と毛細血管瘤の有病率の関係は、負の相関関係が認められた。高グルコース濃度曝露により周皮細胞中の ROS 産生および VEGF mRNA 発現は増加し、 $[^3\text{H}]$ Thymidine 取り込み量は減少した。これらの変化は SDH を過剰発現するとさらに強まった。フィダレスタットは SDH 過剰発現細胞における増強作用を抑制した。SDT ラットを用いた検討では、牽引性網膜剥離に類似した網膜隆起または視神経周囲の広範囲な蛍光漏出を伴う網膜症が SDT ラットで認められたがフィダレスタットはこの発現を抑制した。この時、フィダレスタットは SDT ラットの眼内液中 VEGF 蛋白増加に対しても抑制作用を示した。本検討結果より、ポリオール代謝異常が初期糖尿病網膜症の発現だけでなく、増殖網膜症の発現に対しても関係することが示唆され、糖尿病網膜症の病態を解明する上で有用な知見となると考えられた。

## 7. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に関し多大なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室 原 英彰 教授に深甚なる謝意を表します。また、糖尿病網膜症の病理評価の遂行に際し、多大なる御指導を賜りました自治医科大学附属さいたま医療センター眼科 梯 彰弘 教授、細胞を用いた評価に際し、御指導を賜りました久留米大学医学部糖尿病性血管合併症病態・治療学講座 山岸 昌一 教授に深謝致します。合わせて、本研究の機会を頂き、終始御懇篤なる御指導および御指導を賜りました株式会社三和化学研究所 鈴木 常正 取締役常務執行役員ならびに温かい御協力を頂きました株式会社三和化学研究所の各位に心より御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

- 1) 厚生労働省, 平成 19 年国民健康・栄養調査報告 (2007).
- 2) 安田美穂, *新しい眼科*, **24**, 1287-1290 (2007).
- 3) 山下英俊, 川崎良 編, *糖尿病網膜症 専門医によるベストアドバイス, 診断と治療社* (2003).
- 4) Kutcher M.E., Herman I.M., *Microvas. Res.*, **77**, 235-246 (2009).
- 5) Orlidge A., D'Amore P.A., *J. Cell Biol.*, **105**, 1455-1462 (1987).
- 6) Sato Y., Rifkin D.B., *J. Cell Biol.*, **109**, 309-315 (1989).
- 7) Motiejunaite R., Kazlauskas A., *Exp. Eye Res.*, **86**, 171-177 (2008).
- 8) Willard A.L., Herman I.M., *J. Ophthalmol.*, 2012, Article ID 209538. (Epub 2012).
- 9) 堀田 饒 編, *糖尿病合併症治療のイノベーション-ARI (アルドース還元酵素阻害薬) -*, 医薬ジャーナル社 (2002).
- 10) Akagi Y., Kador P.F., Kuwabara T., Kinoshita J.H., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **24**, 1516-1519 (1983).
- 11) Yanoff M., Fine B.S., 15 DIABETES MELLITUS, in Yanoff, M., Fine, B.S. (Ed), *Ocular Pathology: A Color Atlas*, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, pp.187-195 (1988).
- 12) McCaleb M.L., McKean M.L., Hohman T.C., Laver N., Robison Jr W.G., *Diabetologia*, **34**, 695-701 (1991).
- 13) Akita M., Mizuno K., Matsubara A., Nakano K., Kurono M., *Acta. Med. Okayama*, **47**, 299-304 (1993).
- 14) Kato N., Yashima S., Suzuki T., Nakayama Y., Jomori T., *J. Diabetes Comp.*, **17**, 374-379 (2003).
- 15) Lee F.K., Cheung M.C., Chung S., *Genomics*, **21**, 354-358 (1994).
- 16) Yamagishi S., Fujimori H., Yonekura H., Yamamoto Y., Yamamoto H., *Diabetologia*, **41**, 1435-1441 (1998).
- 17) Amano S., Yamagishi S., Kato N., Inagaki Y., Okamoto T., Makino M., Taniko K., Hirooka H., Jomori T., Takeuchi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**, 183-188 (2002).
- 18) Guerrant G., Moss C.W., *Anal. Chem.*, **56**, 633-638 (1984).
- 19) Kakehashi A., Saito Y., Mori K., Sugi N., Ono R., Yamagami H., Shinohara M., Tamemoto H., Ishikawa S.E., Kawakami M., Kanazawa Y., *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **22**, 455-461 (2006).
- 20) Kakehashi A., Takezawa M., Toyoda F., Kinoshita N., Kambara C., Yamagami H., Kato N., Ishikawa S., Kawakami M., Kanazawa Y., *Open Diabetes J.*, **4**, 101-107 (2011).
- 21) Shepro D., Morel N.M.L., *FASEB J.*, **7**, 1031-1038 (1993).
- 22) Tooke J.E., *Clin. Sci.*, **70**, 119-125 (1986).
- 23) Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel

- H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E., Nguyen H.V., Aiello L.M., Ferrara N., King G.L., *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1480-1487 (1994).
- 24) Yamagishi S., Kobayashi K., Yamamoto H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 418-425 (1993).
- 25) Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T., D'Amico D.J., Folkman J., Yeo T.K., Yeo K.T., *Am. J. Ophthalmol.*, **118**, 445-450 (1994).
- 26) Murata T., Ishibashi T., Khalil A., Hata Y., Yoshikawa H., Inomata H., *Ophthalmic. Res.*, **27**, 48-52 (1995).
- 27) Tolentino M.J., Miller J.W., Gragoudas E.S., Chatzistefanou K., Ferrara N., Adamis A.P., *Arch. Ophthalmol.*, **114**, 964-970 (1996).
- 28) Tilton R.G., Chang K., Nyengaard J.R., Van den Enden M., Ido Y., Williamson J. R., *Diabetes*, **44**, 234-242 (1995).
- 29) Shinohara M., Masuyama T., Shoda T., Takahashi T., Katsuda Y., Komeda K., Kuroki M., Kakehashi A., Kanazawa Y., *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, **1**, 89-100 (2000).
- 30) Shinohara M., Masuyama T., Kakehashi A., In: Shafrir, E., Ed. *Animal models of diabetes-frontiers in research.2nd ed.* CRC Press, Boca Raton(FL), pp. 311-321 (2007).
- 31) Aiello L.P., Pierce E.A., Foley E.D., Takagi H., Chen H., Riddle L., Ferrara N., King G.L., Smith L.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 10457-10461 (1995).
- 32) Pe'er J., Folberg R., Itin A., Gnessin H., Hemo I., Keshet E., *Br. J. Ophthalmol.*, **80**, 241-245 (1996).
- 33) Tolentino M.J., Miller J.W., Gragoudas E.S., Jakobiec F.A., Flynn E., Chatzistefanou K., Ferrara N., Adamis A.P., *Ophthalmology*, **103**, 1820-1828 (1996).

## 9. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（乙 341 号）の内容を中心にまとめたものである。